Lane Medical Library

Beitrag zur Kenntnis des tierischen Sinistrins

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Bayerischen Friedrich-Alexanders-Universität Erlangen

vorgelegt von

Dr. phil. (chem.) Friedrich Julius May

in Feuchtwangen

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 10. 30

Erschienen in der „Zeitschrift für Biologie“, Band 91, Heft 3, 1931

J. F. LEHMANNS VERLAG MÜNCHEN 2 SW

Referent: Geheimrat Professor Dr. E. Weinland

Dekan: Professor Dr. Wintz

Zeitschrift für Biologie Bd. 91.
J. F. Lehmanns Verlag, München 1931.

Beitrag zur Kenntnis des tierischen Sinistrins.

Von **F. May.**

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Erlangen.)

(Der Schriftleitung zugegangen am 6. Dezember 1930.)

Im Jahre 1885 endeckte Hammarsten[1]) in der Eiweißdrüse von Helix pomatia ein Polysaccharid, das die Ebene des polarisierten Lichtes links drehte, das keine Jodreaktion gab und von Speichel nicht angegriffen wurde. Dieses nannte er tierisches Sinistrin. Während er in der Eiweißdrüse echtes Glykogen vermißte, fand er solches in der Mitteldarmdrüse dieser Tiere. 1921 sprach Schmiedeberg[2]) die Vermutung aus, daß es sich bei dem Sinistrin um ein Glucopentosan handelt. 1925 fand Levene[3]) in Helix aspersa und Helix pomatia kein Glykogen, wohl aber ein Polysaccharid, das inaktiv war oder rechts drehte und nach der Hydrolyse Galaktose ergab und zwar in der Menge von 60% als Glucose berechnet. Es dürfte sich dabei um relativ unreine Präparate des Hammarstenschen Sinistrins gehandelt haben. Eine nähere Untersuchung des Körpers erschien wünschenswert und wurde nach der folgenden Methode vorgenommen.

Das Ausgangsmaterial wurde aus Weinbergschnecken nach der Pflügerschen Methodik der Glykogendarstellung gewonnen. Dieses Material, das zunächst als ein Glykogen bezeichnet wurde, war von Herrn Dr. v. Brand im physiologischen Institut dargestellt, worüber er selbst berichten wird. Für die freundliche Überlassung des Präparats möchte ich ihm an dieser Stelle bestens danken. Qualitative Vorproben ergaben, daß nach der Inversion dieses Material eine größere Menge Glucose und eine kleinere Menge Galaktose enthielt. Da nach den Leveneschen Befunden das Sinistrin Galaktose enthielt, war wahrscheinlich dieses in dem Gemenge enthalten. Die Abtrennung des Sinistrins aus dem Polysaccharidgemisch geschah folgendermaßen.

Abtrennung des tierischen Sinistrins.

100 gr der nach Pflüger aus Helix pomatia gewonnenen Polysaccharide werden mit 500 ccm filtrierter Speichellösung (1 Teil Speichel + 1 Teil destilliertes Wasser) unter Toluolzusatz 24 Stunden im Brutschrank bei ca. 40° C gehalten, dann wird mit dem doppelten Volumen Alkohol gefällt, die auf einem Filter gesammelte Ausflockung im Wasser gelöst und erneut wie oben verspeichelt. Nach Fällung mit dem dreifachen Volumen Alkohol

[1]) Pflügers Archiv **36** (1885).
[2]) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. **87** (1920).
[3]) Journ. of biol. Chem. **65** (1925).

und Abfiltrieren desselben wird der Filterrückstand im Wasser gelöst und erneut 48 Stunden wie oben verspeichelt. Das wieder ausgefällte und im Wasser gelöste Produkt wird bei einer Alkalikonzentration von 15% eine Stunde im siedenden Wasserbad erhitzt, nach Filtrieren und Abstumpfen mit HCL neuerdings mit Alkohol gefällt. Das Präparat wird in Wasser gelöst, mit HCL angesäuert, filtriert und gefällt. Weiterhin wird 2× aus alkalischer, 3× aus sauerer und 1× aus neutraler Lösung gefällt. Dann wird die Substanz nochmals 12 Stunden wie oben verspeichelt, wobei die Reduktionsproben negativ bleiben. Das Präparat wird in Wasser gelöst und bei einer KOH-Konzentration von 15% nochmals eine Stunde auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nun wird viermal aus alkalischer, zweimal aus saurer, zweimal aus genau neutraler Lösung und einmal mit absolut reinem 96%igem Alkohol aus neutraler Lösung gefällt. Hierauf wird das Präparat wiederholt mit reinem absoluten Alkohol und trockenem Äther gewaschen. Wo nicht anders bemerkt, erfolgen die Fällungen mit dem dreifachen Volumen 96%igen Alkohol. Der verspeichelbare Anteil wurde in gesonderten Versuchen untersucht und dabei gefunden, daß es sich um echtes Glykogen handelt. Der Schmelzpunkt des dargestellten Osazons, welches in der Hitze ausfiel, betrug 204° C. Mikroskopisch zeigten sich die typischen Glucosazonkristalle.

Eigenschaften des tierischen Sinistrins.

Das Sinistrin war ein sehr lockeres rein weißes Pulver, das in den folgenden Eigenschaften mit Glykogen übereinstimmte:

1. Vollständige und leichte Wasserlöslichkeit.
2. Unempfindlichkeit gegen Kochen mit Lauge jeder Konzentration.
3. Unlöslichkeit in Alkohol und Äther.
4. Leichtere Ausfällbarkeit alkalischer Lösungen durch Alkohol.
5. Schwerere Ausfällbarkeit durch Alkohol mit steigender Reinheit des Sinistrins.
6. Opaleszenz der Lösung.
7. Verschwinden der Opaleszenz und Alkoholfällbarkeit nach Erhitzen mit verdünnten Säuren.
8. Quantitative Adsorption an Kupferhydroxyd.

Die von Glykogen abweichenden Eigenschaften waren folgende:

1. Fehlen der Jodreaktion.
2. Entstehen eines blauen Niederschlags beim Kochen mit Kupfersulfat und überschüssiger Lauge.
3. Die optische Aktivität, diese wurde im Mittel als $\alpha_D = -13{,}55^0$ bestimmt.
4. Die nach der Inversion entstehende Hexose. Auf diese wird weiter unten eingegangen.

In dem Sinistrin waren negativ die Lasseingnesche Stickstoffprobe, die Millonsche Probe sowie die Pentosenproben. Deshalb kann es sich nicht um ein Glucopentosan handeln, wie Schmiedeberg annahm.

Untersuchung des Aschegehalts des Sinistrins.

Das Sinistrinpräparat enthielt im Mittel 2,15% Asche. Die qualitativen Proben waren positiv für das Fe^{+++}- und PO_4^{---}-Jon, negativ für Ca^{++}-, SO_4^{--}-, Cl^-- und Cu^{++}-Jon. Demzufolge war das vorliegende Sinistrin nicht wie jenes von Levene durch Mucoitinschwefelsäure verunreinigt.

Untersuchung des invertierten tierischen Sinistrins.

In Sinistrinlösungen, die mit Salzsäure invertiert waren, wurden die abspaltbaren Hexosen nach der Methode von Fehling-Lehmann-Schoorl[4]), die Aldosen nach Willstätter-Schudel[5]) und die Galaktose nach der Schleimsäuremethode von van der Haar[6] bestimmt. Die gute Übereinstimmung der nach den verschiedenen Methoden gewonnenen Analysenresultate (vgl. Belege) zeigen, daß es sich um eine Aldose handeln muß, und nur um eine Aldohexose, die bei der Oxydation Schleimsäure liefert. Da das nach der Inversion dargestellte Osazon bei 186° C schmolz und Gärungsversuche nach dreistündigem Aufenthalt im Brutschrank negativ blieben, während sie nach 60 Stunden positiv waren, kann es sich nur um Galaktose handeln. Die Galaktoseausbeute betrug als Galaktose berechnet 100,13 % des Sinistrins, als polymerisierte Galaktose berechnet 90,12 %. Da das Sinistrin vor der Hydrolyse nicht reduzierte, dürfte die Galaktose im Sinistrin als polymerisierte Galaktose vorliegen. Es handelt sich also beim Sinistrin um ein kompliziertes Galaktosepolysaccharid, das aus 90 % Galaktose und 10 % eines noch unbekannten Körpers besteht.

Bestimmt man in einer invertierten Sinistrinlösung den Gehalt der Lösung an Galaktose und zugleich das optische Drehungsvermögen dieser invertierten Lösung und berechnet aus den erhaltenen Werten die spezifische Drehung (auf die obige Galaktosemenge berechnet), so kommt man zu einem Wert von +60,7°. Dieser Wert unterscheidet sich merklich von dem für Galaktose geforderten von +80,5°. Ob es sich darum handelt, daß die restlichen 9,88 % den Drehungswert der Galaktose herabdrücken, oder ob in den 9,88 % unaufgeklärter Substanz ein stark links drehender Körper vorliegt, oder ob endlich verschiedene Galaktosemodifikationen vorliegen, muß weitere Forschung ergeben. Sofalls es sich bei den 9,88 % um einen linksdrehenden Körper handelt, würde sich die spezifische Drehung desselben zu etwa —200° berechnen.

1. Qualitative Untersuchungen.

1. Osazonprobe. In einer mit HCL invertierten Sinistrinprobe wurde das Osazon wie üblich dargestellt. Dieses fiel bereits in der Hitze aus und zeigte mikroskopisch die breiten, gelben, schwertförmigen Kristalle des Galaktosazons. Der Schmelzpunkt des gewaschenen und aus Pyridin und Benzol umkristallisierten Osazons betrug 186° C. Es handelt sich demnach um Galaktosazon.

2. Nachweis der Schleimsäure. Nach der Oxydation mit Salpetersäure bildete sich auf dem Boden des Becherglases ein weißer Niederschlag; dieser wurde auf einem Filter gesammelt mit Wasser gewaschen und bei 100°C getrocknet. Der Schmelzpunkt der Substanz betrug 214—215° C. Eine Probe der Substanz wurde auf dem Objektträger mit Ammoniak gelöst und mit einigen Kriställchen Thalliumsulfat versetzt. Es bildeten sich kleine, recht-

---

[4]) Zit. nach van der Haar: Anl. zum Nachw. z. Trennung u. Best. der Monosaccharide u. Aldehydsäuren. Berlin 1920.

[5]) Ber. d. deutsch. Chem. Ges. **51** (1918).

[6]) l. c.

eckige, farblose Stäbchen von schleimsaurem Thallium. Mit ganz verdünnter Eisenchloridlösung gab eine Lösung des Ammonsalzes der Substanz eine Gelbfärbung. Es handelt sich demnach um Schleimsäure.

2. Quantitative Untersuchungen.

1. Aschebestimmungen:

0,6082 gr Sinistrin ergaben 0,0129 gr Asche = 2,12%
0,4948 gr Sinistrin ergaben 0,0106 gr Asche = 2,14% } Mittelwert = 2,15%.
0,2364 gr Sinistrin ergaben 0,0052 gr Asche = 2,20%

2. Bestimmung der spezifischen Drehung des nicht invertierten Sinistrins.

Eine 4,842%ige Lösung (als aschefrei berechnet) dreht im 5 cm Rohr — 0,329° daraus α_D = —13,59°.

Eine 4,949%ige Lösung (als aschefrei berechnet) dreht im 5 cm Rohr —0,334° daraus α_D = —13,50°.

Mittlere Drehung α_D = —13,55°.

3. Bestimmung der Galaktosemengen im invertierten Sinistrin.

a) Schleimsäurebestimmung nach der Methode von van der Haar.[1])

0,3389 gr Sinistrin (Gewicht vor der Inversion als aschefrei berechnet) ergaben nach der Inversion 0,2378 gr Schleimsäure:

nach Kurve 1 für reine Galaktose 0,328: gr Galaktose = 0,2952 gr polymerisierte Galaktose,

nach Kurve 2 für Galaktose mit Saccharose auf 1000 mgr gebracht 0,347: gr Galaktose = 0,3123 gr polymerisierte Galaktose.

Nach Kurve 1 ergeben sich also 96,78 % Galaktose = 87,10 % polymerisierte Galaktose im Sinistrin.

Nach Kurve 2 ergeben sich also 102,39% Galaktose = 92,14 % polymerisierte Galaktose im Sinistrin.

b) Hexosenbestimmung nach Fehling-Lehmann-Schoorl.

67,79 mgr Sinistrin (Gewicht vor der Inversion als aschefrei berechnet) entsprechen nach der Inversion 18,03 ccm $\frac{n}{10}$ Na-thiosulfatlösung = 65,8 mgr Galaktose = 97,06% Galaktose.

Dies entspricht 59,22 mgr polymerisierter Galaktose = 87,36 % polymerisierter Galaktose.

62,88 mgr Sinistrin (Gewicht vor der Inversion als aschefrei berechnet) entsprechen nach der Inversion 17,47 ccm $\frac{n}{10}$ Na-thiosulfat = 63,70 mgr Galaktose = 101,30% Galaktose.

Dies entspricht 57,33 mgr polymerisierter Galaktose = 91,18 % polymerisierter Galaktose.

c) Bestimmung der Aldohexosen nach Willstätter-Schudel.

---

[1]) van der Haar gibt für die Berechnung der Galaktose aus der Schleimsäure zwei Kurven an, die eine für reine Galaktose, die andere für Galaktose, die mit Saccharose aus 1000 mgr gebracht wurde. Letztere gibt im allgemeinen höhere Werte, da die Saccharose offenbar die Schleimsäure am Kristallisieren hindert. Wenn unser Polysaccharid als Hexose auch nur Galaktose abspaltet, muß es doch fraglich erscheinen, ob die nicht identifizierten 10% vielleicht einen ähnlichen Einfluß haben wie die Saccharose. Deshalb werden beide Werte angegeben.

84,74 mgr Sinistrin (Gewicht vor der Inversion als aschefrei berechnet) entsprechen nach der Inversion 9,71 $\frac{n}{10}$ Jodlösung = 87,39 mgr Aldohexose = 103,13% Aldohexose.

Dies entspricht 78,65 mgr polymerisierter Aldohexose = 92,81 % polymerisierter Aldohexose.

Mittlerer Gehalt von Galaktose im Sinistrin 100,13 %.
Mittlerer Gehalt an polymerisierter Galaktose im Sinistrin 90,12 %.

4. Bestimmung der spezifischen Drehung des invertierten tierischen Sinistrins.

Eine 3,810 %ige Sinistrinlösung (Gewicht vor der Inversion als aschefrei berechnet) dreht nach der Inversion die anfänglich 6 Stunden lang bei einer HCL-Konzentration von $\frac{n}{10}$, dann noch eine Stunde bei einer HCL-Konzentration von 2,2 % im siedenden Wasserbad durchgeführt wurde im 10 cm Rohr + 2,32°. Bei Einsetzung des oben berechneten Mittelwertes von 90,12 % an polymerisierter Galaktose hatte die Lösung einen Gehalt an polymerisierter Galaktose von 3,434 %. Dies entspricht einem Galaktosegehalt von 3,81 %, daraus würde sich bei Nichtberücksichtigung der 9,88 % nichtidentifizierter Substanz die spezifische Drehung der gefundenen Galaktose zu α_D = + 60,9° berechnen.

Eine 1,6947 %ige Sinistrinlösung (Gehalt der Lösung an nicht invertiertem Sinistrin als aschefrei berechnet) wird im siedenden Wasserbad bei einer HCL-Konzentration von $\frac{n}{10}$ HCL invertiert. Beobachtete Drehungen nach einem Aufenthalt im Wasserbad von:

1 Stunde im 10 cm-Rohr = + 0,293°,
1½ Stunden im 10 cm-Rohr = + 0,434°,
2½ Stunden im 10 cm-Rohr = + 0,634°,
4½ Stunden im 22 cm-Rohr = + 1,828°,
7 Stunden im 22 cm-Rohr = + 2,059°,
9½ Stunden im 22 cm-Rohr = + 2,160°,
13¼ Stunden im 22 cm-Rohr = + 2,169° Drehung konstant.

Bei Einsetzung des Mittelwertes von 90,12 % an polymerisierter Galaktose hatte die Sinistrinlösung einen Gehalt an polymerisierter Galaktose von 1,527 %. Dies entspricht einem Galaktosegehalt von 1,697 %. Daraus würde sich bei Nichtberücksichtigung der 9,88 % nichtidentifizierter Substanz die spezifische Drehung der gefundenen Galaktose zu α_D + 58,1° berechnen.

Eine 3,144 %ige Sinistrinlösung (Gehalt der Lösung an nicht invertiertem Sinistrin als aschefrei berechnet) wird bei einer HCL-Konzentration von 2,2 % im siedenden Wasserbad invertiert.

Beobachtete Drehungen nach einem Aufenthalt im Wasserbad von

½ Stunde im 10 cm-Rohr = + 1,470°,
1 Stunde im 10 cm-Rohr = + 1,849°,
1½ Stunden im 10 cm-Rohr = + 1,936°,
2 Stunden im 5 cm-Rohr = + 0,990°,
2½ Stunden im 5 cm-Rohr = + 0,992° Drehung konstant.

Nach jeder Polarisation wurde in der Lösung der Gehalt an reduzierender Substanz nach Fehling-Lehmann-Schoorl bestimmt. 2 ccm der Lösung entsprachen demnach nach einem Aufenthalt im Wasserbad von

½ Stunde = 13,64 ccm $\frac{n}{10}$ Thiosulfatlösung,

1 Stunde = 16,92 ccm $\frac{n}{10}$ Thiosulfatlösung,

1½ Stunden = 17,35 ccm $\frac{n}{10}$ Thiosulfatlösung,

2 Stunden = 17,39 ccm $\frac{n}{10}$ Thiosulfatlösung,

2½ Stunden = 17,47 ccm $\frac{n}{10}$ Thiosulfatlösung.

Der letzte nach der Fehling-Lehmann-Schoorlschen Methode bestimmte Wert entspricht, wie unter *3b* gezeigt wurde, einem Gehalt von 91,18 % an polymerisierter Galaktose im Sinistrin. Demnach hatte die Lösung einen Gehalt von 2,867 % an polymerisierter Galaktose bzw. 3,185 % Galaktose. Daraus würde sich bei Nichtberücksichtigung der nicht identifizierten Substanz die spezifische Drehung der gefundenen Galaktose zu $\alpha_D = + 62{,}3^0$ berechnen. Bei Einsetzen des Mittelwertes von 90,12 % an polymerisierter Galaktose im Sinistrin würde sich die spezifische Drehung der Galaktose zu $\alpha_D = + 63{,}0^0$ berechnen.

Die mittlere Drehung der Galaktose im invertierten Sinistrin berechnet sich aus den gesamten Analysen ohne Berücksichtigung der nicht identifizierten Substanz demnach zu $\alpha_D = + 60{,}7^0$.

Zusammenfassung.

In der vorliegenden Untersuchung wurde gezeigt, daß im Körper der Weinbergschnecke zwei Glykogene vorkommen, welche aus Traubenzucker bzw. Galaktose aufgebaut sind. In der mir bekannten Literatur wurden tierische Glykogene aus verschiedenen Hexosen bis jetzt nicht exakt beschrieben, dagegen werden die verschiedensten spezifischen Drehungen für die erhaltenen Glykogene angegeben. E. Weinland[7]) fand z. B. bei Ascaris lumbricoides ein Glykogen mit α_D von $+ 183^0$ und bei Taenia expansa ein Glykogen mit α_D von $+ 173^0$. Ob in diesen Glykogenen verschiedene Zukkerarten vorliegen, oder ob die verschiedenen spezifischen Drehungen durch den Grad der Polymerisation, d. h. der Größe des Glykogenmoleküls bedingt sind, müssen weitere Untersuchungen ergeben.

Zum Schlusse möchte ich Herrn Geheimrat Professor D. E. W. Weinland bestens danken für das Interesse, das er an meiner Arbeit nahm.

[7]) Zeitschr. f. Biologie **41**, 69, (1901).

Lebenslauf

Geboren bin ich am 22. Juli 1898 zu Feuchtwangen in Bayern als Sohn des Kaufmanns Otto Ludwig May und seiner Ehefrau Gabriele May, geb. Schröppel. Die Schule besuchte ich in Feuchtwangen, Marktbreit und Dinkelsbühl. Mit Datum vom 7. Mai 1919 erhielt ich das Reifezeugnis des Neuen Realgymnasiums in München. Vom 15. März 1916 bis Juni 1919 gehörte ich der ehem. K. B. Flieger-Ersatz-Abteilung bezw. der Feld-Flieger-Abteilung 304 an. Vom 18. Februar 1919 bis 1. September 1924 studierte ich an der Universität München und Erlangen Chemie. Das chemische Verbandszeugnis erhielt ich am 21. Februar 1921 in München. In Erlangen promovierte ich am 1. September 1924 an der philosophis chen Fakultät II. Sektion in Chemie. Das Medizinstudium begann ich im Wintersemester 1924 an der Universität Erlangen, die ärztliche Vorprüfung legte ich am 15. November 1926 ab, die ärztliche Prüfung in der Zeit vom 1. April 1929 bis 18. Mai 1929. Die Approbation als Arzt erhielt ich am 31. Mai 1930. Seit Frühjahr 1926 bin ich Assistent der chemischen Abteilung des Physiologischen Instituts der Universität Erlangen. Ich bin bayerischer Staatsangehöriger.

Erlangen, den 22. Oktober 1930.

Dr. phil. Friedrich Julius May.